(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2010 年 9 月 23 日(23.09.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/106788 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12Q 1/533* (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C12N 以*90* (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/001850

(22) 国際出願日: 2010 年 3 月 15 日(15.03.2010)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2009-065110 2009 年 3 月 17 日(17.03.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 凸版印刷株式会社 (TOPPAN PRINTING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1108560 東京都台東区台東 1 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP). 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 Osaka (JP). 学校法人九州文化学園 (Kyushu Bunka Gakuen School Foundation) [JP/JP]; 〒8593298 長崎県佐世保市ハウステンボス町 4 番地 3 Nagasaki (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 人江新司 (IRIE, Shinii) [JP/JP]; 〒1108560 東京都台東区台東 1 丁目 5 番 1 号 凸版印刷株式会社内 Tokyo (JP). 辻村晃 (TSUJIMURA, Akira) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 宮川康 (MIYAGAWA, Yasushi) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 田中宏光 (TANAKA, Hiromitsu) [JP/JP]; 〒8593298 長崎県佐世保市ハウステンボス町 2825-7 学校法人九州文化学園長崎国際大学内 Nagasaki (JP).

(74) 代理人: 鈴木史朗, 外 (SUZUKI, Shirou et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目 9 番 2 号 Tokyo (JP).

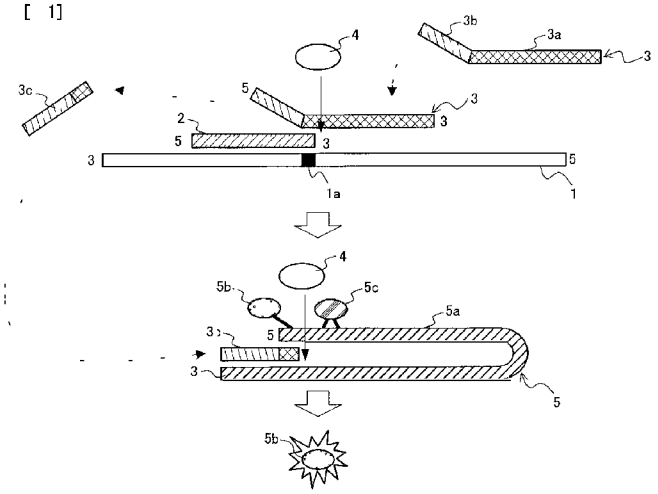
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: FERTILITY TEST METHOD, FERTILITY TEST KIT, POLYNUCLEOTIDE, POLYPEPTIDE AND ANTIBODY

(54) 発明の名称: 妊牢性検査方法、妊牢性検査キット、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、及び抗体

[1]



(57) Abstract: Provided are a fertility test/diagnosis method whereby the possibility of fertility can be estimated on the basis of the ability of sperm to fuse to an egg and a cause of infertility can be identified; a polynucleotide which is used in this method; and a fertility test kit. A fertility test/diagnosis method which comprises a detection step for detecting the presence or absence of deletion or mutation of human PGAM4 gene in a biological sample that is collected from a human subject; a polynucleotide comprising the base sequence of human wild type PGAM4 gene or the base sequence of the translation region of said gene, which comprises a sequence of 10-100 consecutive bases including a single nucleotide polymorphism mutation site that correlates highly with fertility; and a fertility test kit which comprises a reagent for detecting the presence or absence of deletion or mutation of human PGAM4 gene.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2010/106788 A1

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), --L ーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, Rの, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第21条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

本発明は、精子におげる卵子への融合能に基づいた妊牢可能性の推定、及び不妊症の原因の同定を可能にする妊牢性検査・診断方法、並びに該方法に用いられるポリヌクレオチド及び妊牢性検査キットを提供することを目的とする。本発明は、ヒトから採取された生体サンフルについて、ヒトのＰＧＡＭ４遺伝子の欠損又は変異の有無を検出する検出工程を有する、妊牢性検査・診断方法、ヒト野生型ＰＧＡＭ４遺伝子の塩基配列または当該遺伝子の翻訳領域の塩基配列からなるポリヌクレオチドにおいて、妊牢性と相関性の高い一塩基置換変異の変異部位を含む１０～１００の連続した塩基配列からなるポリヌクレオチド、及びヒトＰＧＡＭ４遺伝子の欠損又は変異の有無を検出するための試薬を含んでいる妊牢性検査キットを提供する。

明 細 書

発明の名称 :

妊芋性検査方法、妊芋性検査キット、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、及び抗体

技術分野

[0001] 本発明は、妊芋可能性の推定及び不妊症の原因の同定を可能にする技術に関するものである。具体的には、妊芋可能性と相関性のある遺伝子の欠損又は変異を検出し、妊芋可能性を検査・診断する方法、並びに、該方法に用いることができるキット、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、及び抗体に関する。

背景技術

[0002] 近年、少子化の問題が頻繁に取り上げられ、この問題を解消するために様々な対策が模索されている。少子化の対策として、不妊症により子供を授からない夫婦を救済することが重要であることは言うまでもなく、有効な不妊治療法の開発が強く望まれている。

[0003] 不妊症の原因は男女同率であるが、男性不妊症は精子形成メカニズムの複雑さから、その治療法も含めて未解明の部分が多く、ヒト精子数の減少や生殖力の低下など生殖にまつわる問題の多くは原因不明である。体外受精（ＩＶＦ；Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ｆｅｒｔｉｌｉｚａｔｉｏｎ）の技術発展により、精子の活動能が低い場合においても妊娠出産が可能となってきているものの、不妊の背後にある分子メカニズムの詳細は依然として明らかになっておらず、適切な治療法の選択が困難な場合や、十分な治療効果が得られない場合も多い。従って、より負担の少ない不妊治療のためには、不妊メカニズムの理解に立った遺伝子診断・生殖補助医療の開発が強く望まれている。

[0004] 非特許文献「によると、マウスにおける雄性不妊の研究により、妊芋性に影響を与える多くの遺伝子の存在が明らかになっており、これらの遺伝子の変異がヒトにおいても男性不妊を引き起こす一因となっている可能性がある

。

一方、精子形成過程の減数分裂後に起こる形態学的変化には、エネルギー代謝に利用される酵素において、精子細胞特異的な構造もしくは機能変化が認められるとされ、精子特異的なｈｅｘｏｋｉｎａｓｅ（非特許文献２参照。）、ｐｈｏｓｐｈｏｇｌｕｃｏｓｅ ｉｓｏｍｅｒａｓｅ (非特許文献３参照。）、ａｌｄｏ ｌａｓｅ（非特許文献４参照。）、ｇｌｙｃｅｒａｌｄｅｈｙｄｅ ３－ｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｄｅｈｙｄｒｏｇｅｎａｓｅ (非特許文献５参照。）、ｐｈｏｓｐｈｏｇｌｙｃｅｒａｔｅ ｋｉｎａｓｅ (非特許文献６参照。）、ｐｈｏｓｐｈｏｇｌｙｃｅｒａｔｅ ｍｕｔａｓｅ (非特許文献７参照。）、ｅｎｏ ｌａｓｅ（非特許文献８参照。）などが活性化される。非特許文献５では、ｇｌｙｃｅｒａｌｄｅｈｙｄｅ ３－ｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｄｅｈｙｄｒｏｇｅｎａｓｅのノックアウトマウス（オス）が不妊となり、精子の運動不良が認められることから、これら精子特異的な解糖系の酵素機能における異常は不妊の原因となる可能性が示唆される。

[0005] マウスにおけるＰｈｏｓｐｈｏｇｌｙｃｅｒａｔｅ ｍｕｔａｓｅ ｆａｍｉｌｙ ｍｅｍｂｅｒ (ＰＧＡＭ) は、Ｐｇａｍ－１とＰｇａｍ－２の２つの遺伝子にコードされ、Ｈ型、Ｍ型のホモ、及びヘテロのＰＧＡＭからなる３種類のアイソザイムを形成する。成長したマウスの睾丸では３種類のアイソザイムが検出されるが、新生児マウスの睾丸ではＭ型アイソザイムは認められず、出生後「４－「６日からＭ型が観察される。（非特許文献９参照。）。転写レベルでは、Ｈ型は脳と腎臓で強く、肝臓・甲状腺・筋肉・心臓で中程度発現しており、Ｍ型は筋肉と睾丸で強く、心臓・肺で中程度発現していることが明らかにされている（非特許文献「０参照。）。ヒト睾丸におけるＰＧＡＭの発現解析はないが、ＰＧＡＭ「（Ｂ型）は肝臓及び脳で発現し、ＰＧＡＭ２（Ｍ型）は筋肉での発現が確認されている（非特許文献「「参照。）。一方、ヒトにおいては、Ｈ型のアイソザイムとしてイントロンが含まれないＰＧＡＭ４（ＰＧＡＭ３、ＰＧＡＭ－Ｂ）が存在することが知られている（非特許文献「２参照）。成熟したヒト精巣においても、Ｈ型に加え

M型のＰＧＡＭが発現していると考えられるが、精巣特異的に発現する遺伝子の多くはイントロンが含まれないため（非特許文献「３、「４参照）、ＰＧＡＭ４の精巣における機能が示唆される。従って、ＰＧＡＭ４をコードする遺伝子における変化は、精子におけるＰＧＡＭ機能に異常をもたらす可能性がある。その結果、解糖系によるエネルギー供給が低下し、精子の運動能が低下することにより受精に障害が起こる可能性が考えられる。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：マザック (Matzuk) 、外「名、ネイチャー・セル・バイオロジー (Nature Cell Biology) 、２００２年、第４（Ｓｕｐｐ「）巻、Ｓ４１～Ｓ４９。

非特許文献2：モリ (Mori) 、外４名、モレキュラー・リプロダクション・アンド・デベロップメント(Molecular reproduction and development)、「９９６年、第４４巻第「号、第「４～２２ページ。

非特許文献3：ブール (Buehr) 、外「名、ジャーナル・オブ・リプロダクション・アンド・ファーティリティ ccournal of reproduction and fertility) 、「９８「年、第６３巻第「号、第「６９～「７３ページ。

非特許文献4：ベムガンチ (Vemuganti) 、外５名、デベロップメンタル・バイオロジー (Developmental biology) 、２００７年、第３０９巻第「号、第「８～３「ページ。

非特許文献5：ミキ (Miki) 、外８名、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 、２００４年、第「０「巻第４７号、第「６５０「～「６５０６ページ。

非特許文献6：マッカレイ (McCarrey) 、外６名、デベロップメンタル・ジェネティックス (Developmental genetics) 、「９９６年、第「９巻第４号、第３２「～３３２ページ。

非特許文献7：ブロセノ (Broceno) 、外４名、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (European ┘ournal of biochemistry) 、「９９５年、第２２７巻第３号、第６２９～６３５ページ。

非特許文献8：フォース (Force) 、外４名、ジャーナル・オブ・アンドロロジー ccournal of andrology) 、２００４年、第２５巻第５号、第８２４～８２９ページ。

非特許文献9：ファンデル (Findele) 、外４名、デベロップメンタル・バイオロジー (Developmental biology) 、「９８７年、第「２４巻第２号、第５６２～５６６ページ。

非特許文献10：ツァン (Zhang) 、外８名、ジーン (Gene) 、２００「年、２６４巻第２号、第２７３～２７９ページ。

非特許文献11：サコダ (Sakoda) 、外４名、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The ┘ournal of biological Ghemistry) 、「９８８年、第２６３巻第３２号、第「６８９９ ～「６９０５ページ。

非特許文献12：“Symbol Report: PGAM4”、[online]、２００５年４月２５日、Human Genome Organisation、[２００８年「２月２日検索]、インターネット〈URL：http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=21731〉

非特許文献13：マッカレイ (McCarrey) 、外「名、ネイチャー (Nature) 、「９８７年、第３２６巻第６「「２号、第５０「～５０５ページ。

非特許文献14：ダール (Dahl) 、外４名、ゲノミクス (Genomics) 、「９９０年、第８巻第２号、第２２５～２３２ページ。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 男性不妊を診断するための有効な遺伝子検査・診断方法は未だ十分に確立されていない。男性不妊の原因は生殖細胞自体の欠失から精子の受精不全まで多岐に渡る。従つて、病態に応じた有効な治療法を確立するためには、様々な病態の原因を特定できる方法が望まれている。

本発明は、上記課題に鑑みてなされたものであり、精子運動におけるエネルギー供給に関わる酵素機能に基づいた妊芋可能性の推定、及び不妊症の原因の同定を可能にする妊芋性検査・診断方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、精巣特異的なPGAM4が機能的に低下すると精子運動におけるエネルギー供給が減少し、受精に至る確率が低下すると考えられることから、ヒトにおける精巣型PGAM4分子が妊芋性に関連し、PGAM4遺伝子の変異は、男性不妊を引き起こす(或いは引き起こしやすい)と考え、ヒトPGAM4遺伝子配列を解析し、ヒトPGAM4遺伝子に男性不妊症に関連した変異を見出し、本発明を完成させるに至った。

[0009] すなわち木発明は下記の構成をとる。

(「) ヒトから採取された生体サンプルについて、ヒトPGAM4遺伝子の欠損又は変異の有無を検出する検出工程を有し、前記検出工程において、翻訳開始コドンのアデニンを第「位の塩基としたときに、ヒトPGAM4遺伝子の翻訳領域の、第75位の塩基、第「38位の塩基、及び第539位の塩基からなる群より選択される「以上の塩基の変異の有無を検出する、妊芋性検査・診断方法。

(2) 前記検査・診断方法の検出行程において、ヒトPGAM4遺伝子の翻訳領域の、第75位の塩基及び第539位の塩基からなる群より選択される「以上の変異の有無を検出する、妊芋性検査・診断方法。

(3) 下記の(a)又は(b)の塩基配列:

(a)配列番号3で表される塩基配列において、「0「番目の塩基がグアニンからシトシンに置換されており、当該「0「番目の塩基を含む「0〜「00の連続した塩基配列;

(b)前記(a)の塩基配列と相補的な塩基配列;

からなるポリヌクレオチド。

(4) 下記の(c)又は(d)の塩基配列:

（ｃ）*m*列番号５で表される塩基配列において、「０「番目の塩基がグアニンからアデニンに置換されており、当該「０「番目の塩基を含む「０～「００の連続した塩基配列；

（ｄ）前記（ｃ）の塩基配列と相補的な塩基配列；

からなることを特徴とするポリヌクレオチド。

（５）*m*列番号「で表される塩基配列において、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の翻訳領域の第７５位の塩基又は第５**３９**位の塩基が置換されており、この置換された塩基を含む「０～「００の連続した塩基配列と、相同的又は相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

（６）*m*列番号「で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドにおいて、第１３８位の塩基がシトシンに置換された塩基配列からなる、ポリヌクレオチド。

（７）ア記（５）又は（６）に記載のポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列からなる、ポリペプチド。

（８）ア記（５）に記載のポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチドと結合し、かつ、配列番号２で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドと結合しない、抗体。

（９）ヒトから採取された生体サンプルについて、発現しているＰＧＡＭ４ポリペプチドの変異の有無を、ア記（８）に記載の抗体を使用することで検出する検出工程を有する、妊芋性検査・診断方法。

（「０）ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の欠損又は変異の有無を検出するための試薬を含む、ヒトの妊芋性検査キット。

（「「）前記ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の欠損又は変異の有無を検出するための試薬が、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の翻訳領域の第７５位の塩基、第１３８位の塩基、及び第５**３９**位の塩基からなる群より選択される「以上の塩基の変異の有無を検出することができる、ア記（「０）記載の妊芋性検査・診断キット。

（「２）前記試薬が、抗ＰＧＡＭ４抗体である、請求項「「記載の妊芋性

検査・診断キット。

（「3）前記試薬が、ヒトPGAM4遺伝子の変異検出部位の塩基を含む領域を増幅することができるプライマーセットである、「記（「「）記載の妊芋性検査キット。

発明の効果

[0010] 本発明の妊芋性検査・診断方法や妊芋性検査・診断キットを用いることにより、ヒトの妊芋可能性の推定や、不妊症の原因の同定を、高精度かつ簡便に行うことができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]インベーダー法の原理を説明する模式図である。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明に係る妊芋性検査・診断方法は、ヒトから採取された生体サンプルについて、ヒトPGAM4遺伝子の欠損又は変異の有無を検出する検出工程を有する。ヒトPGAM4遺伝子の欠損や特定の塩基の変異は、男性不妊との相関性が高い。したがって、被験者から生体サンプルを採取し、この生体サンプルを用いて被験者のPGAM4遺伝子に欠損又は変異があるか否かを調べることにより、妊芋可能性の推定及び不妊症の原因の同定が可能になる。

[0013] 配列番号「は、ジェンバンク（GenBank）にアクセッション番号NC_000023.9で登録されている野生型PGAM4遺伝子の転写産物の塩基配列の中から、翻訳領域のみを抽出したものである。配列番号「に示すように、野生型ヒトPGAM4遺伝子は、765bpからなる翻訳領域を有している。また、配列番号2は、野生型ヒトPGAM4タンパク質の推定アミノ酸配列を示すものである。ヒトゲノムプロジェクトによって構築されたヒトゲノムリソースによれば、ヒトPGAM4遺伝子は、ヒトX染色体長腕に位置している（Xq「3）。

[0014] 本願発明者らは、後述する実施例に示す調査の結果、男性不妊症患者からなる集団の中に、配列番号「に示すヒトPGAM4遺伝子の翻訳領域におい

て塩基が置換している患者がいることを見出した。一方、これらの塩基置換は、妊芋性が確認されている男性からなる集団では見られなかった。

[0015] ヒトPGAM4遺伝子に上記の置換変異が起こると、正常なタンパク質が発現しなくなったり、発現効率が低下するおそれがある。それゆえ、ヒトPGAM4遺伝子の置換変異は、正常なPGAM4タンパク質の翻訳量が低下することにより不妊症を引き起こす可能性が高いと推測される。

[0016] 本発明において、変異とは、遺伝子の塩基配列において、塩基が欠失・置換・挿入されていることを意味する。本発明に係る妊芋性検査・診断方法の検出工程において検出されるPGAM4遺伝子の変異は、男性不妊との相関性が高い変異である。具体的には、以下に述べる4個の変異のうち、少なくとも1つを検出することにより、検出工程に用いられた生体サンプルを採取されたヒトが、妊芋させやすいか否か、不妊症であるとすでに診断されている場合には、不妊症の原因がPGAM4遺伝子の変異によるものであるか否かを検査することができ、この検査結果を受けて、医師が妊芋性の診断を行うことができる。なお、「PGAM4遺伝子の翻訳領域の第X位の塩基」とは、翻訳開始コドンのアデニンを第「位の塩基としたときに、ヒトPGAM4遺伝子の翻訳領域の第X位の塩基」を意味する。

[0017] 男性不妊との相関性が高い変異として、PGAM4遺伝子の翻訳領域の第75位のグアニンがシトシンに置換している変異がある。この塩基置換によって、推定アミノ酸配列の第25位のトリプトファンがシステインにコードされるようになる。

[0018] また、PGAM4遺伝子の翻訳領域の第「38位のアデニンがシトシンに置換している変異がある。当該第「38位の塩基は、推定アミノ酸配列の第46位のアルギニンをコードするものであるが、この塩基置換によっては、コードされるアミノ酸は変化せず、アルギニンのままである。

[0019] また、PGAM4遺伝子の翻訳領域の第539位のグアニンがアデニンに置換している変異がある。この塩基置換によって推定アミノ酸配列の第180位のアルギニンがヒスチジンにコードされるようになる。

[0020] 本発明に係る妊芋性検査・診断方法においては、特に、ＰＧＡＭ４遺伝子の翻訳領域の第７５位の塩基又は第５３９位の塩基を検出することが好ましい。より妊芋性との相関性が高いためである。また、本発明に係る妊芋性検査・診断方法においては、上記の変異のうち、「種類の変異を検出するものであってもよく、複数種類の変異を検出するものであってもよい。

[0021] 本発明に係る妊芋性検査・診断方法は、これらの一塩基変異を、妊芋性の遺伝子マーカーとして用いるものである。たとえば、これらの塩基の変異が検出されなかった場合、検出工程に用いられた生体サンプルが回収された被験者は、妊芋性に問題がない可能性が高いと推定できる。また、被験者がすでに不妊症患者であると診断されている場合は、不妊症の原因が、ＰＧＡＭ４遺伝子の機能欠損以外のものによる可能性が高いと判定できる。一方、変異が検出された場合は、その被験者は、妊芋可能性が低いと推定される。したがって被験者が不妊症患者には、本発明の妊芋性検査・診断方法を使用することで、その原因がＰＧＡＭ４遺伝子の欠損又は変異に起因した、ＰＧＡＭ４分子の機能欠損が原因である可能性が高いと判定できる。したがって、そのような被験者に対して、たとえばＴＥＳＥ－ＩＣＳＩ (Ｔｅｓｔｉｃｕｌａｒ ｓｐｅｒｍ ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ－Ｉｎｔｒａｃｙｔｏｐｌａｓｍｉｃ ｓｐｅｒｍ ｉｎｊｅｃｔｉｏｎ；精巣生検－顕微授精）等の適切な処置を施すことにより、早期に疾患を治癒することができる。すなわち、本発明に係る妊芋性検査方法は、妊芋可能性の推定及び不妊症の原因の同定を目的とした検査方法ともいえるものであり、該方法の結果により、不妊症の診断を行う上で重要な情報が提供されるため、被験者に対して、現存の治療法の中から適格な選択を提示することができる。このため、本発明に係る妊芋性検査方法等は、低妊芋性又は不妊症の診断において好ましく用いることができる。

[0022] 本発明に係る妊芋性検査・診断方法において用いられる生体サンプルは、ヒトから採取されたものであって、ＰＧＡＭ４遺伝子由来の核酸やタンパク質を含有することが期待できるサンプルであれば、特に限定されるものでは

なく、たとえば、血液、血清、血漿、頬の内側等の粘膜、精液、精巣生検によって被験者から採取した精巣内の組織（例えば精細管）、精子細胞、精漿等を挙げることができる。ここで、ＰＧＡＭ４遺伝子由来の核酸とは、ＰＧＡＭ４遺伝子のゲノムＤＮＡや、該遺伝子の転写産物であるｍＲＮＡ等を意味する。また、ＰＧＡＭ４遺伝子由来のタンパク質とは、ＰＧＡＭ４遺伝子から発現されるタンパウ質であるＰＧＡＭ４分子やその分解物等を意味する。特に、ＰＧＡＭ４遺伝子由来のタンパク質を検出対象とする場合には、生体サンプルとして、精液、精巣生検によって被験者から採取した精巣内の組織（例えば精細管）、精子細胞、精漿等を用いることが好ましい。精漿は、たとえ精子細胞を含んでいなくても、精子細胞が破壊等されることにより放出された、精子細胞で発現するタンパク質を含んでいると考えられている。

[0023] なお、生体サンプルを適宜希釈等することによりそのまま検出工程に用いてもよく、該生体サンプルから予め抽出したゲノムＤＮＡ等のＤＮＡを用いてもよい。また、該生体サンプルからｍＲＮＡ等のＲＮＡを抽出した後、逆転写反応により該ＲＮＡから合成したｃＤＮＡ を検出工程に用いてもよい。

[0024] 本発明に係る妊芋性検査・診断方法の検出工程において、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の欠損又は変異を検出する方法としては特に限定されず、遺伝子の変異や多型の検出等において用いられる公知の各種手法、たとえば、サンガー法を基礎とする塩基配列決定法、インベーダー法、Ｔａｑｍａｎプローブ法、ＳＭＭＤ法 (Ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓ Ｍｕｌｔｉｐｌｅ Ｍｕｔａｔｉｏｎ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ)、ＰＣＲ－ＲＦＬＰ (ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｃｈａｉｎ ｒｅａｃｔｉｏｎ－ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ ｆｒａｇｍｅｎｔ Ｉｅｎｇｔｈ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍ) 法、ＭＡＳＡ法、及び塩基伸長法、並びにそれらを改変した方法等を用いることができる。検出感度及び精度に優れているため、インベーダー法やＴａｑｍａｎプローブ法等のように、変異部位を特異的に認識する塩基配列を有するプローブやプライマーを用いて検出する方法であることが好ましい。

[0025] ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の欠損又は変異を検出するためのプローブやプライ

マーは、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子及びその周辺の塩基配列に基づき、常法により設計し、合成することができる。なお、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子及びその周辺の塩基配列は、たとえばＮＣＢＩヒトゲノムリソース（ＮＣＢＩ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓｏｕｒｃｅｓ：ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｇｅｎｏｍｅ／ｇｕｉｄｅ／ｈｕｍａｎ／）等の公知のデータベースから当業者であれば容易に人手することができる。

[0026] たとえば、ｍＲＮＡやこれから逆転写反応により得られるｃＤＮＡ又はゲノムＤＮＡを用いて、ＰＧＡＭ４遺伝子の翻訳領域の第７５位の塩基の変異の有無を検出するためのプライマー等としては、配列番号３で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドにおいて、「０「番目の塩基がグアニンからシトシンに置換されており、当該「０「番目の塩基を含む「０～「００の連続した塩基配列と、相同的又は相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを用いることができる。また、当該第７５位の塩基において、変異が生じていない野生型であることを検出するためのプライマー等として、同じく配列番号３で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、「０「番目の塩基を含む「０～「００の連続した塩基配列と、相同的又は相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを用いることができる。なお、配列番号３で表される塩基配列は、ＰＧＡＭ４遺伝子の部分塩基配列であって、「０「番目の塩基が、ＰＧＡＭ４遺伝子の翻訳領域の第７５位の塩基に相当する。

[0027] 同じく、ｍＲＮＡやこれから逆転写反応により得られるｃＤＮＡ又はゲノムＤＮＡを用いて、ＰＧＡＭ４遺伝子の翻訳領域の第５３９位の塩基の変異の有無を検出するためのプライマー等としては、配列番号５で表される塩基配列において、「０「番目の塩基がグアニンからアデニンに置換されており、当該「０「番目の塩基を含む「０～「００の連続した塩基配列と、相同的又は相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを用いることができる。また、当該第５３９位の塩基において、変異が生じていない野生型であることを検出するためのプライマー等として、同じく配列番号５で表される塩基配列において、「０「番目の塩基を含む「０～「００の連続した塩基配列と、

相同的又は相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを用いることができる。なお、配列番号５で表される塩基配列は、ＰＧＡＭ４遺伝子の部分塩基配列であって、「０「番目の塩基が、ＰＧＡＭ４遺伝子の翻訳領域の第５３９位の塩基に相当する。

[0028] 同じく、ｍＲＮＡやこれから逆転写反応により得られるｃDNA 又はゲノムＤＮＡを用いて、ＰＧＡＭ４遺伝子の翻訳領域の第「３８位の塩基の変異の有無を検出するためのプライマー等としては、配列番号４で表される塩基配列において、「０「番目の塩基がアデニンからシトシンに置換されており、当該「０「番目の塩基を含む「０～「００の連続した塩基配列と、相同的又は相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを用いることができる。また、当該第「３８位の塩基において、変異が生じていない野生型であることを検出するためのプライマー等として、同じく配列番号４で表される塩基配列において、「０「番目の塩基を含む「０～「００の連続した塩基配列と、相同的又は相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを用いることができる。なお、配列番号４で表される塩基配列は、ＰＧＡＭ４遺伝子の部分塩基配列であって、「０「番目の塩基が、ＰＧＡＭ４遺伝子の翻訳領域の第「３８位の塩基に相当する。

[0029] このように、上述する各変異の有無を検出するためのプライマー等としては、翻訳開始コドンのアデニンを第「位の塩基としたときに、ヒト野生型ＰＧＡＭ４遺伝子の翻訳領域の塩基配列（配列番号「で表される塩基配列）において、当該変異部位を含む「０～「００の連続した塩基配列と、相同的又は相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを、それぞれ用いることができる。また、ヒト野生型ＰＧＡＭ４遺伝子のゲノムＤＮＡにおいて、当該変異部位を含む「０～「００の連続した塩基配列と、相同的又は相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを、それぞれ用いることもできる。これらのポリヌクレオチドの長さとしては、「０～７０塩基長であることが好ましく、「０～５０塩基長であることがより好ましく、「０～３０塩基長であることがさらに好ましい。なお、変異の有無の検出精度が改善されるため、該ポ

リヌクレオチド中、当該変異部位の塩基と対合し得る塩基の位置は特に限定されるものではないが、3’末端から「～5塩基以内にあることが好ましく、3’末端にあることがより好ましい。

[0030] なお、ヒトの妊芋性を検査するためのキットであって、ヒトPGAM4遺伝子の欠損又は変異の有無を検出するための試薬を含んでいる妊芋性検査キットを用いることにより、本発明に係る妊芋性検査・診断方法をより簡便に行うことができる。本発明に係る妊芋性検査キットとしては、翻訳開始コドンのアデニンを第「位の塩基としたときに、ヒトPGAM4遺伝子の翻訳領域の第75位の塩基、第「38位の塩基、又は第539位の塩基の変異を検出するための試薬を含んでいることが好ましく、第75位の塩基又は第539位の塩基の変異を検出するための試薬を含んでいることがより好ましい。また、これらの変異のうちの、「種類の変異を検出するための試薬を含むキットであってもよく、複数種類の変異を検出するための試薬を含むキットであってもよい。

[0031] これらの塩基の変異を検出するための試薬としては、たとえば、当該塩基を含む核酸領域をPCR等により増幅させるためのプライマーの組と、得られた増幅産物の塩基配列を決定するための塩基配列決定試薬とを含んでいてもよい。該塩基配列決定試薬としては、たとえば、上述したヒト野生型PGAM4遺伝子の塩基配列Xはその翻訳領域の塩基配列において、当該変異部位を含む「0～「00の連続した塩基配列と、相同的又は相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドを、予め蛍光色素等により標識したハイブリダイゼーションプローブ等が挙げられる。その他、ヒトPGAM4遺伝子の欠損又は変異を検出する方法がPCR－RF」P法である場合には、該RF」P法において用いられる制限酵素であってもよい。

[0032] また、本発明に係る妊芋性検査・診断方法及び妊芋性検査キットは、ヒトPGAM4遺伝子の機能欠損を引き起こす変異の有無を検出するものであれば、その態様は特に限定されるものではない。たとえば、上記妊芋性検査・診断方法及び妊芋性検査キットは、被験者のヒトPGAM4遺伝子に、該遺

伝子の機能欠損を引き起こす変異が含まれていることを検出するものであってもよく、被験者のヒトPGAM4遺伝子に、該遺伝子の機能欠損を引き起こす変異が含まれていないことを検出するものであってもよい。

[0033] より具体的には、一実施形態において、本発明に係る妊芋性検査・診断方法及び妊芋性検査キットは、ヒトPGAM4遺伝子内の領域のうち、上記の各変異部位（以下、「変異検出部位」という）の塩基を含む領域の塩基配列を決定することにより、上記の置換変異の有無を検出するものであってもよい。塩基配列の決定には、サンガー法やこれを応用した公知の各種手法を用いることができる。

[0034] この場合、妊芋性検査キットには、ヒトPGAM4遺伝子の欠損又は変異の有無を検出するための試薬として、ヒトPGAM4遺伝子の上記の変異検出部位を含む領域を増幅させるために、変異検出部位を挟むようにして設計されたプライマーの組が含まれることができる。このプライマーの緒には、より詳細には、ヒトPGAM4遺伝子の変異検出部位よりも上流の塩基配列の一部または全部を有するプライマーと、ヒトPGAM4遺伝子の変異検出部位よりも下流の塩基配列の一部Xは全部と相補的な塩基配列を有するプライマーとが含まれる。

[0035] 被験者から採取された生体サンプルに含まれるゲノムDNAを鋳型として上記のプライマーの組を用いてPCRを行うことにより、ヒトPGAM4遺伝子の変異検出部位の塩基を含む領域がDNAフラグメントとして増幅され、さらに、上記のプライマーの組の一方又は両方のプライマーを用いて塩基配列の決定を行うことにより、置換変異の有無を確実かつ簡便に検出することができる。塩基配列の決定は、たとえば、ABI－PRISM 3「0 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc.）等を取扱説明書に従って使用することにより、簡単に実施することができる。

[0036] また、DNAフラグメントの増幅のためのPCRに用いられるプライマーとは別のプライマーを、塩基配列の決定に用いられるプライマーとして用い

てもよい。すなわち、妊芋性検査キットには、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の欠損又は変異の有無を検出するための試薬として、ＤＮＡフラグメントの増幅のためのプライマーの組と、塩基配列の決定に用いられるプライマーとを含んでいてもよい。

[0037] 上記のＤＮＡフラグメントの増幅のためのプライマーの組は、互いのプライマーによって挟まれる領域の長さが５ｋｂ以下であることが好ましく、３ｋｂ以下であることがより好ましく、２ｋｂ以下であることがさらに好ましく、１．５ｋｂ以下であることが特に好ましい。互いのプライマーによって挟まれる領域の長さを短くすることによつて、上記の変異検出部位の塩基を含む領域の増幅を効果的に行うことができる。

[0038] また、塩基配列の決定に用いられるプライマーは、上記の変異検出部位の塩基から２ｋｂ以内の位置に設定されることが好ましく、１．５ｋｂ以内の位置に設定されることが好ましく、１．０ｋｂ以内の位置に設定されることがより好ましく、０．７ｋｂ以内の位置に設定されることが特に好ましい。上記の構成により、塩基配列の決定を正確に行うことができる。

[0039] さらに、塩基配列の決定に用いるプライマーは、上記の変異検出部位の塩基から２００ｂｐ以上離れた位置に設定されることが好ましく、３００ｂｐ以上離れた位置に設定されることがより好ましく、４００ｂｐ以上離れた位置に設定されることがさらに好ましく、５００ｂｐ以上離れた位置に設定されることが特に好ましい。また、上記プライマーの組は、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の変異検出部位の塩基を含む２００ｂｐ以上の領域を増幅させるものであることが好ましい。プライマーの近傍は、塩基配列の決定結果が不正確になる傾向にあるが、上記の構成により、塩基配列の決定を正確に行うことができる。

[0040] なお、それぞれのプライマーは、ＰＧＡＭ４遺伝子又はその周辺と同一の塩基配列、或いは相補的な塩基配列を少なくとも１０塩基以上有することが好ましく、１５塩基以上有することがより好ましく、１８塩基以上有することがさらに好ましく、２０塩基以上有することが特に好ましい。ＰＧＡＭ４遺伝子又はその周辺と同一の（或いは相補的な）塩基配列の長さを長くする

ことにより、ＰＧＡＭ４遺伝子の各変異部位のうちの少なくとも一方を含む目的の領域のみを確実に増幅させることができる。

[0041] 上記のプライマーの組としては、たとえば、配列番号６で表される塩基配列からなるプライマーと配列番号７で表される塩基配列からなるプライマーとからなる組を用いることができるが、本発明に用いることのできるプライマーの塩基配列がこの配列に限定されないことはいうまでもない。ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の塩基配列及びその周辺の塩基配列は、当業者であれば上述したヒトゲノムリソースやジェンバンク（ＧｅｎＢａｎｋ）から容易に入手することができるので、入手した塩基配列を基に、ＯＩｉｇｏ（登録商標、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　Ｉｎｃ.）又はＧＥＮＥＴＹＸ（ソフトウエア開発）等を用いてプライマーを設計することができる。

各プライマーは、たとえばホスホロアミダイト法等の公知の方法によって合成することができ、たとえばＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｃ.の３９２型シンセサイザー等を取扱説明書に従って使用することによって簡単に合成することができる。

[0042] なお、上記の各プライマーには、蛍光標識が付されていてもよい。プライマーに蛍光標識が付されている場合、ダイプライマー法によって、放射性同位元素を用いることなく増幅領域の塩基配列を決定することができる。

一方、各プライマーに蛍光標識が付されていない場合、ダイターミネータ法によつて塩基配列を決定することができる。この場合、上記妊芋性検査キットには、上記のプライマーの緒に加えて、Ａ、Ｔ、Ｇ、Ｃの各単量体からなるデオキシリボ核酸、蛍光標識されＡ、Ｔ、Ｇ、Ｃの各単量体からなるジデオキシリボ核酸（所謂ダイターミネータ）、及びポリメラーゼ等がさらに含まれていてもよい。

[0043] 一実施形態において、本発明に係る妊芋性検査・診断方法及び妊芋性検査キットは、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の上記の変異検出部位における塩基の置換変異の有無を、インベーダー法によって検出するものであってもよい。インベーダー法の詳細については、Ｌｙａｍｉｃｈｅｖらによる論文（Lyamichev

V et al, Nat biotechnol. 17, 292, 1999) に記載されており、本明細書ではこれを援用する。

[0044] 図「は、インベーダー法の原理を説明する模式図である。インベーダー法では、非蛍光標識プローブのインベーダーオリゴ2及びアレルオリゴ3と、蛍光標識プローブのフレットプローブ5とが用いられる。

インベーダープローブ2は、ターゲット遺伝子「と相補的な塩基配列を有し、かつ、3'末端の塩基がターゲット遺伝子「の変異（又は一塩基多型）検出部位「aと対応するように設計される（いずれの塩基とも相補的な塩基ではない）。一方、アレルオリゴ3は、ターゲット遺伝子「とは無関係な塩基配列であるフラップ3bと、ターゲット遺伝子「と相補的な塩基配列を有し、かつ、5'末端の塩基がターゲット遺伝子「の変異（又は一塩基多型）検出部位「aに相補するように設計されたヌクレオチド3aとが連結したものである。ここで、フラップ3bは、ヌクレオチド3aの5'末端側に連結されている。

このように設計されたインベーダープローブ2とアレルオリゴ3をターゲット遺伝子「とハイブリダイゼーションさせると、ターゲット遺伝子「に対してアレルオリゴ3とインベーダープローブ2が重なり合った構造をとりながらハイブリダイズし、変異検出部位「aにおいてインベーダープローブ2がアレルオリゴ3の下に「塩基のみ侵入する。すると、フラップエンドヌクレアーゼ（「クリアベース（cleavase）」ともいう）4がこの侵人構造を認識し、アレルオリゴ3を重なった塩基の3'側で切断する。その結果、フラップ3bと変異検出部位とが連結したフラップ遊離体3cが生成される。

フレットプローブ5は、5'末端側が自身とハイブリダイゼーションでき、かつ、3'末端側がフラップ3bとハイブリダイゼーションできるヌクレオチド5aと、蛍光色素5bと、クエンチャー（発光抑制体）5cとからなる。ここで、ヌクレオチド5aは、3'末端がフラップ遊離体3cと相補的な塩基配列となっている。また、蛍光色素5bは、ヌクレオチド5aの5'

末端に結合している。ただし、フレットプローブ５においては、クエンチャー５Ｃにより蛍光色素５ｂの蛍光が抑制されている。

このようなフレットプローブ５に対してフラップ遊離体３ｃがハイブリダイゼーションすると、フラップ遊離体３ｃの変異検出部位について、再び３進入構造が形成される。その結果、上述のフラップエンドヌクレアーゼ４がこの侵入構造を再び認識し、フレットプローブ５の５’末端部分が切断される。その結果、フレットプローブ５の５’末端に結合していた蛍光色素５ｂが遊離し、蛍光が生じる。

[0045] 従って、本発明に係る妊芋性検査・診断方法及び妊芋性検査キットは、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の欠損又は変異の有無をインベーダー法により検出するものであってもよい。この場合、妊芋性検査キットには、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の欠損又は変異の有無を検出するための試薬として、インベーダープローブ２、アレルオリゴ３及びフレットプローブ５等が含まれることが好ましい。

[0046] 置換変異が有る場合に蛍光が生じるようにする場合には、インベーダープローブ２は、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子と相補的な塩基配列を有し、かつ、３’末端の塩基が変異型ＰＧＡＭ４遺伝子の各変異型塩基と対応するように設計される（但し、相補的でない）。また、アレルオリゴ３のヌクレオチド３ａは、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子と相補的な塩基配列を有し、かつ、５’末端の塩基が変異型ＰＧＡＭ４遺伝子の上記の変異型塩基と相補するように設計される。そして、フレットプローブ５は、上記インベーダープローブ２及び上記アレルオリゴ３が変異型ＰＧＡＭ４遺伝子とハイブリダイズしてインベーダープローブ２による侵入構造が形成された場合にフラップエンドヌクレアーゼ４によって切断されるフラップ遊離体３ｃを検出できるように設計される。

上記の構成により、被験者のＰＧＡＭ４遺伝子において上記の塩基が変異型置換している場合は、ターゲット遺伝子にハイブリダイズしたヌクレオチド３ａの５’末端にインベーダープローブ２の３’末端が侵入することによ

り、ヌクレオチド3ｃが切り出されて蛍光が生じる。一方、被験者のＰＧＡＭ４遺伝子が野生型である場合は、インベーダープローブ２の末端部分による侵人構造が形成されないのでヌクレオチド3ｃが切り出されないため蛍光が生じない。

[0047] また、上記の例では、被験者の有するＰＧＡＭ４遺伝子が置換変異型の場合に蛍光が生じる構成としたが、本発明はこれに限定されず、被験者の有するＰＧＡＭ４遺伝子が野生型の場合に蛍光が生じ、置換変異型の場合に蛍光が抑制される構成としてもよく、或いは野生型と変異型で異なった蛍光色素を使用するなど様々に改変することができる。

なお、上記の各方法において、ＰＧＡＭ４遺伝子のセンス鎖（コドンをコードする側の鎖）を調べることによって置換変異の有無を判定する構成について詳細に説明したが、アンチセンス鎖を調べることによっても同様に判定することができるのはいうまでもない。

[0048] 本発明に係る妊芋性検査・診断方法及び妊芋性検査キットは、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の機能欠損を引き起こす変異の有無をタンパク質レベルで検出するものであってもよい。すなわち、本発明に係る検出方法及び妊芋性検査キットは、ヒトにおいて、正常なヒトＰＧＡＭ４タンパク質が発現しているか否かを判定するものであってもよく、異常なヒトＰＧＡＭ４タンパク質が発現しているか否かを判定するものであってもよい。ここで、正常タンパク質とは、ヒト野生型ＰＧＡＭ４ポリペプチドであり、配列番号２のアミノ酸配列からなるポリペプチドを意味する。一方、異常タンパク質とは、たとえば、ヒト野生型ＰＧＡＭ４遺伝子の翻訳領域の塩基配列からなるポリヌクレオチドにおいて、一塩基置換変異等の変異が生じているポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列であって、配列番号２で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドとは異なるポリペプチドを意味する。具体的には、翻訳開始コドンのアデニンを第「位の塩基としたときに、ヒト野生型ＰＧＡＭ４遺伝子の翻訳領域の塩基配列（配列番号「で表される塩基配列）からなるポリヌクレオチドにおいて、第７５位の塩基がシトシンに置換された塩基

配列、又は第５３９位の塩基がチミンに置換された塩基配列からなることを特徴とするポリヌクレオチドである。

[0049] なお、生体サンプル中に含まれているヒトＰＧＡＭ４タンパク質が正常タンパク質か異常タンパウ質かを検出する方法としては、特に限定されるものではないが、たとえば、ヒトＰＧＡＭ４タンパク質の正常タンパク質と異常タンパク質のいずれか一方のみを認識する抗体を用いることにより、生体サンプル中に含まれているヒトＰＧＡＭ４タンパク質が正常タンパク質か異常タンパク質かを検出することができる。また、本発明に係る妊芋性検査キットに含まれるヒトＰＧＡＭ４遺伝子の欠損又は変異の有無を検出するための試薬として、ヒトＰＧＡＭ４の異常タンパク質と結合し、かつ、正常タンパク質と結合しないことを特徴とする抗体を用いてもよい。なお、このような抗体は、ヒトＰＧＡＭ４の異常タンパク質を抗原として、常法により作製したポリクローナル抗体やモノクローナル抗体の中から、ヒトＰＧＡＭ４の正常タンパク質と交差しないものを選択することにより、作製することができる。

[0050] このような抗体は、具体的には、上述した第７５位もしくは第５３９位のアミノ酸の置換変異を含むヒト変異型ＰＧＡＭ４ポリペプチド又は変異部分を含むそのフラグメントを抗原として、実験動物を免疫処置することにより製造することができる（たとえば、Chow，M. et al.，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 910-914；Francis, M. J. et al, J. Gen. Virol. 66: 2347-2354 (1985)を参照のこと。）

一般的には、動物は遊離ペプチドによって免疫化することができる。ただし、遊離ペプチドを高分子キャリア（たとえば、ヒーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）または破傷風トキシド）にカップリングすることによって効率的に免疫化できるようになる場合もある。たとえば、システインを含有するペプチドは、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢＳ）のようなリンカーによってキャリアにカップリングすることができる。一方、他のペプチドは、グルタルアルデヒドのようなよ

り一般的な連結剤を使用してキャリアにカップリングすることができる。

ウサギ、ラット及びマウスのような動物は、遊離ペプチドまたはキャリアーカップリングペプチドと、Ｆｒｅｕｎｄのアジュバントとを含むエマルジョンを腹腔内及び／または皮内に注射することにより免疫化することができる。ミ」ＩＳＡにより検出できる程度に有用な力価の抗ペプチド抗体を得るためには、約２週間の間隔で追加免疫注射を行うことが望ましい。

そして、免疫化された動物から血液を採取し、血清からＩｇＧ画分を抽出することにより抗体を得ることができる。また、抗体を公知の技術によつて精製することにより、抗体の力価が向上する。

本発明に係る抗体は、上述したヒト変異型ＰＧＡＭ４ポリペプチドに結合する一方で、ヒト野生型ＰＧＡＭ４ポリペプチドには結合しないものである。それゆえ、上記の手順によって得られた抗体のうち、ヒト野生型ＰＧＡＭ４タンパク質と結合しないものを選出することによって、本発明に係る抗体を得ることができる。上記の選出を容易にするためには、動物に注射する抗原ペプチドとして、ヒト変異型ＰＧＡＭ４ポリペプチドの変異部分とその周辺のアミノ酸配列からなる「0残基程度のオリゴペプチドを選択することが望ましい。

[0051] このように、一実施形態において、本発明に係る妊芋性検査・診断方法及び妊芋性検査キットは、上述した各変異のうち、第７５位もしくは第５３９位の少なくとも一の塩基置換を含むヒト変異型ＰＧＡＭ４遺伝子によってコードされるヒト変異型ＰＧＡＭ４タンパク質と結合し、かつ、ヒト野生型ＰＧＡＭ４タンパク質と結合しない抗体を用いて、ヒトから採取された生体サンプル中にヒト変異型ＰＧＡＭ４タンパク質が発現しているかを判定するものであってもよい。

上記抗体を用いてヒト変異型ＰＧＡＭ４タンパク質が発現しているか否かを調べ、被験者においてヒト変異型ＰＧＡＭ４タンパク質が発現されていると判定された場合は、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子に上述した置換変異が生じていることが強く示唆され、同時に、その被験者は、妊芋可能性が低い、あるい

は不妊症の可能性が高いと推定することができる。また、被験者が不妊症の場合は、不妊症の原因がヒトＰＧＡＭ４遺伝子の異常に起因していると推定することができる。

[0052] また、他の実施形態において、本発明に係る検出方法及び妊芋性検査キットは、ヒトにおいて正常なヒトＰＧＡＭ４タンパク質が発現しているか否かを判定するものであってもよく、正常なヒトＰＧＡＭ４タンパク質の発現量の多寡を判定するものであってもよい。

より具体的には、本発明に係る妊芋性診断方法の検出工程が、ヒト野生型ＰＧＡＭ４タンパク質と結合し、かつ、異常ヒトＰＧＡＭ４タンパク質と結合しないことを特徴とする抗体を用いることにより、生体サンプル中にヒト野生型ＰＧＡＭ４タンパク質が存在しているか否かを検出するものであってもよい。また、本発明に係る妊芋性診断キットに含まれるヒトＰＧＡＭ４遺伝子の欠損又は変異の有無を検出するための試薬として、ヒト野生型ＰＧＡＭ４タンパク質と結合し、かつ、異常タンパク質と結合しないことを特徴とする抗体（抗ＰＧＡＭ４抗体）を用いてもよい。

抗ＰＧＡＭ４抗体を用いてヒトＰＧＡＭ４タンパク質の発現の有無や発現量を調べ、被験者においてヒトＰＧＡＭ４タンパク質が発現していないと判定された場合や、ヒトＰＧＡＭ４タンパク質の発現量が遺伝子変異が生じていない被験者よりも少ないと判定された場合には、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子が欠失または変異していることが示唆され、同時に、その被験者は、妊芋可能性が低い、あるいは不妊症の可能性が高いと推定することができる。また、被験者が不妊症の場合には、不妊症の原因が正常なヒトＰＧＡＭ４タンパク質が発現していないことによるものと推定することができる。

[0053] 抗体を用いて、生体サンプル中のヒト野生型ＰＧＡＭ４タンパク質またはヒト変異型ＰＧＡＭ４タンパク質を検出する手法は、特に限定されず、公知のいずれの手法を用いてもよい。たとえば、ウエスタンブロッティング、ＥＬＩＳＡ（Ｅｎｚｙｍｅ－ｌｉｎｋｅｄ Ｉｍｍｕｎｏｓｏｒｂｅｎｔ Ａｓｓａｙ）等が挙げられる。

妊芋性診断キットがウエスタンブロッティングまたは三」1ＳＡを利用する妊芋性診断方法に好適なキットである場合、妊芋性診断キットには、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の欠損又は変異の有無を検出するための試薬として、抗ヒト野生型ＰＧＡＭ４タンパク質抗体又は抗ヒト変異型ＰＧＡＭ４抗体に加えて、発色反応に必要なペルオキシダーゼ等の特異的酵素で標識した抗グロブリン抗体が含まれていてもょい。

[0054] 次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能である。すなわち、請求項に示した範囲で適宜変更した技術的手段を組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

実施例 1

[0055] 本実施例においては、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子配列を解析し、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子に男性不妊症に関連した変異の検出を行った。

[解析対象者]

非閉塞性不妊症の日本人男性被験者（Ｎ＝３８３）を、精子形成の欠損の程度に基づいてサブグループに分割した。これらの不妊症被験者のうち、「３％は非閉塞性無精子症であり、３「％は重症精子過少症（く５ｘ「０°細胞／ｍ」）であり、３３％が運動無力症であり、残り２３％が形態的に異常のないものであった。遺伝的要因を調べたところ、これらの被験者は何れも原発性特発性不妊症であった（Guideline for sperm donation. Fertil Steril. 2004: 82(suppl 1): Sg-S12）。コントロール群（Ｎ＝２５「）は産婦人科医院にいる妊婦のもとに生まれた子供の父親であり、妊芋性が確認された男性とした。全ての提供者からは、サンプルがゲノムＤＮＡ解析に使用される旨のインフォームドコンセントを取得した（大阪大学病院泌尿器科）。

[0056] [変異スクリーニング]

以下の各工程では、特に断りがない限り、常法又はキットに添付されている取扱説明書に従って各処理を行った。

ゲノムＤＮＡは、プロテアーゼ処理とフェノール抽出により血液サンプル

又は精液サンプルから単離し調製した（Sambrnnk J et al. , lsnlatiom of DNA from Mammalian Cells. New York: Cold Sp ring Harbor Press. 1989: pp . 9.16-9.21）。血液由来ゲノムＤＮＡはＧｅｎｏｍｉＰｈｉ（Ｇ三ヘルスケアバイオサイエンス社製）を用いて増幅したＤＮＡを使用した。

ＰＧＡＭ４遺伝子のタンパク質をコードする翻訳領域を含むｎＮＡを、表「に示したプライマー 及びプライマーＲを用いて、表２に示したＰＣＲ反応条件に従って増幅した。

なお、プライマー は、５’末端の塩基が、ＰＧＡＭ４遺伝子の塩基配列において、翻訳開始コドンのアデニンを第「位の塩基とした場合の第－９９位の塩基とハイブリダイズするように設計されたプライマーである。一方、プライマーＲは、５’末端の塩基が、ＰＧＡＭ４遺伝子の塩基配列において、翻訳開始コドンのアデニンを第「位の塩基とした場合の第８５０位の塩基とハイブリダイズするように設計されたプライマーである。

[0057] [表1]

	Sequence 5’-3’
Primer F	GAG TGGTTAGGGAATAAGGGTGGG
Primer R	AGTGTGACATG TGCAGGTGGGAGG

[0058] [表2]

Primers	Denaturing temp. and time	Annealing temp. and time	Extension temp. and time	cycle number	Product size
P imer F P imer R	98℃, 10sec	68℃, 30sec	72℃, 60seo	40cycle	948bp

[0059] 得られたＰＣＲ増幅フラグメントを、ＡＭＰｕｒｅ（ＡＳｅｎｃｏｕｒｔ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社製）にて精製した。この精製されたＰＣＲ増幅フラグメントを鋳型とし、当該アンプリコンを増幅した際に使用したプライマーを用いて、シーケンシング反応を行った。具体的には、ＢｉｇＤｙｅ（登録商標）Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ Ｖ３．１ Ｃｙｃｌｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ Ｋｉｔ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて行い、Ｃｌｅａ

ｎＳ≡Ｑ（Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社製）にて精製した反応産物をＡＢＩ－ＰＲＩＳＭ　３７３０　Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（アプライドバイオシステムズ社製）によって解析した。両方向の決定結果を比較し、塩基配列を決定した。

[0060] ［シークエンス解析結果］

不妊症被験者及び妊孕性確認被験者のそれぞれについて、プライマーＰＣＲで増幅されるアンプリコンの塩基配列を解析したところ、表３に示すように、置換変異が合計４個検出された。

このうち、アミノ酸の変化を伴う置換変異は２個であり、このうちの「個は妊孕性確認被験者にも検出されたが、残る「個は妊孕性確認被験者からは全く検出されなかった。また、妊孕性確認被験者からも検出された２個の置換変異のうちの「個は、不妊症被験者に有意に多かった。

一方、アミノ酸の変化を伴わない２個の置換変異のうち、「個は妊孕性確認被験者にも検出されたが、残る「個は妊卒性確認被験者からは全く検出されなかった。

これらの結果から、妊孕性確認被験者からは全く検出されなかった２個の置換変異と、不妊症被験者に有意に多かった「個の置換変異が、妊孕性との相関性があることが確認された。以下、この３個の置換変異について、それぞれ説明する。

[0061] ［表３］

Position		Genotype	Number (%) of SNP				P value
Nucleotide	Amino acid		Infertile		Proven fertile		
75	Trp25	G/G	翻	(95.5)	238	(98.8)	
	Trp25Cys	C/C	何	(4.5)	3	(1.2)	0.025
123	Gly41	C/C	380	(99.7)	249	(99.6)	0.750
	−	T/T	1	(0.3)	1	(0.4)	
138	Arg46	A/A	380	(99.7)	249	(100)	0.764
	−	C/C	1	(0.3)	0	(0)	
539	Arg180	G/G	382	(99.7)	251	(100)	0.418
	Arg180His	A/A	1	(0.3)	0	(0)	

[0062] ＰＧＡＭ４遺伝子の翻訳領域の第「３Ｒ位のアデニンが両方のアレルにお

いてシトシンに置換している被験者が、不妊症被験者３８「人の中に「人見出された。この塩基置換によって推定アミノ酸配列の第４６位のアルギニンは変わらない。この置換変異は、妊芋性確認被験者２４９人には見出されなかった。

[0063] ＰＧＡＭ４遺伝子の翻訳領域の第７５位のグアニンが両方のアレルにおいてシトシンに置換している被験者が、不妊症被験者３７６人の中に「7人見出された。この塩基置換によって推定アミノ酸配列の第２５位のトリプトファンがシステインにコードされるようになる。この置換変異は、妊芋性確認被験者２４「人のうち、両方のアレルにおいてシトシンに置換している被験者が３人見出された。

[0064] また、ＰＧＡＭ４遺伝子の翻訳領域の第５３９位のグアニンが両方のアレルにおいてアデニンに置換している被験者が、不妊症被験者３８３人の中に「人見出された。この塩基置換によって推定アミノ酸配列の第「８０位のアルギニンがヒスチジンにコードされるようになる。この置換変異は、妊芋性確認被験者２５「人には見出されなかった。

[0065] これらの置換変異の中でも、特に、第７５位の塩基の置換変異の出現率が高く、男性不妊症との相関性が高かった。

[0066] 上記の置換変異が見出された被験者は、正常なＰＧＡＭ４のタンパク質の翻訳量が低減したことにより、ＰＧＡＭ４タンパク質の働きが不十分になって不妊症になったものと推測された。なお、妊芋性確認被験者では全く検出されなかったアミノ酸置換を伴わない置換変異（第「３８位の置換変異）は、転写産物の安定性や翻訳効率に影響を与えるか、或いは他の変異とリンクした変異である可能性がある。

[0067] 木研究により、上記の置換変異以外にも一塩基多型がＰＧＡＭ４遺伝子内に見出されたが、これらの一塩基多型は、そのパターンが不妊症被験者と妊芋性確認被験者との間で有意な相違を見せず、特に妊芋性に影響を与えるものとは認められなかった。

産業上の利用可能性

[0068] 本発明に係る妊芋性検査・診断方法等を用いることにより、ヒトの妊芋可能性の推定や、不妊症の原因の同定を行うことができ、妊症の現象解明や治療法の確立並びに不妊症の診断に有用なツールが提供されるので、製薬分野や医療分野において木発明を好適に利用することができる。たとえば、本発明であるPGAM4遺伝子の他に、既知の発明であるSCOT-t遺伝子（特許第4229973号）、PRM2遺伝子（特許第4276691）、TP遺伝子（特開2007-089409）、ccntrin1遺伝子（特開2008-237114）、TSSK遺伝子（特開2008-067649）、Meisetz遺伝子（特開2009-065882）の遺伝子変異やSNPを同時に調べることにより、日木人男性不妊症の10%以上の男性不妊症原因遺伝子を明らかにすることができる。男性の不妊症の原因に性染色体異常（cm染色体変異）が知られており、その出現頻度は5ー10%であるが、先進国において男性不妊症患者の原因診断として性染色体異常の検査がルーティーンに行われている。この現状を考えると、本発明を含むキットは10%以上の男性不妊症の原因遺伝子を同定でき、科学的根拠に基づいた不妊症治療法の選択や患者のカウンセリングのために、臨床現場での有用なツールとしてルーティーンに利用されることが期待される。

符号の説明

[0069] 「…ターゲット遺伝子、「a…変異（又は一塩基多型）検出部位、2…インベーダーオリゴ、3…アレルオリゴ、3a…ヌクレオチド、3b…フラップ、3c…フラップ遊離体、4…フラップエンドヌクレアーゼ、5…フレットプローブ、5a…ヌクレオチド、5b…蛍光色素、5c…クエンチャー（発光抑制体）。

請求の範囲

[請求項1] ヒトから採取された生体サンプルについて、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の欠損又は変異の有無を検出する検出工程を有し、

前記検出工程において、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の翻訳領域の、第７５位の塩基、第１３８位の塩基、及び第５３９位の塩基からなる群より選択される「以上の塩基の変異の有無を検出する、妊芋性検査方法。

[請求項2] 前記検出工程において、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の翻訳領域の、第７５位の塩基及び第５３９位の塩基からなる群より選択される「以上の変異の有無を検出する、請求項「記載の妊芋性検査方法。

[請求項3] 下記の（ａ）又は（ｂ）の塩基配列：

（ａ）*m*列番号３で表される塩基配列において、「０「番目の塩基がグアニンからシトシンに置換されており、当該「０「番目の塩基を含む「０～「００の連続した塩基配列；

（ｂ）前記（ａ）の塩基配列と相補的な塩基配列；

からなるポリヌクレオチド。

[請求項4] 下記の（ｃ）又は（ｄ）の塩基配列：

（ｃ）*m*列番号５で表される塩基配列において、「０「番目の塩基がグアニンからアデニンに置換されており、当該「０「番目の塩基を含む「０～「００の連続した塩基配列；

（ｄ）前記（ｃ）の塩基配列と相補的な塩基配列；

からなるポリヌクレオチド。

[請求項5] 配列番号「で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドにおいて、第７５位の塩基がシトシンに置換された塩基配列Ｘは第５３９位の塩基がアデニンに置換された塩基配列からなる、ポリヌクレオチド。

[請求項6] 配列番号「で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドにおいて、第１３８位の塩基がシトシンに置換された塩基配列からなる、ポリヌクレオチド。

[請求項7] 請求項５又は６に記載のポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列からなる、ポリペプチド。

[請求項8] 請求項５に記載のポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチドと結合し、かつ、配列番号２で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドと結合しない、抗体。

[請求項9] ヒトから採取された生体サンプルについて、発現しているＰＧＡＭ４ポリペプチドの変異の有無を、請求項８に記載の抗体を使用することで検出する検出工程を有する、妊芋性検査方法。

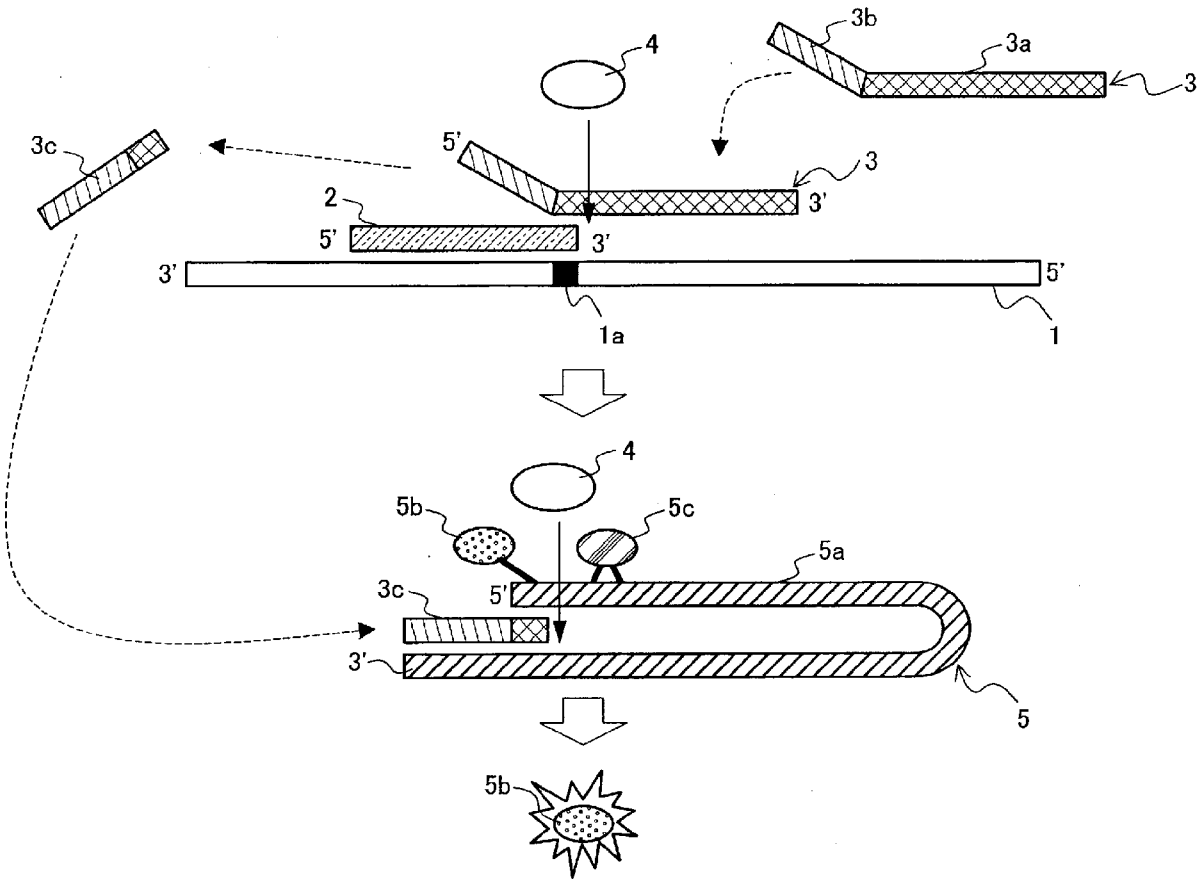
[請求項10] ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の欠損又は変異の有無を検出するための試薬を含む、ヒトの妊芋性検査キット。

[請求項11] 前記ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の欠損又は変異の有無を検出するための試薬が、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の翻訳領域の第７５位の塩基、第「３８位の塩基、及び第５３９位の塩基からなる群より選択される「以上の塩基の変異の有無を検出することができる、請求項「０記載の妊芋性検査キット。

[請求項12] 前記試薬が、抗ＰＧＡＭ４抗体である、請求項「「記載の妊芋性検査キット。

[請求項13] 前記試薬が、ヒトＰＧＡＭ４遺伝子の変異検出部位の塩基を含む領域を増幅することができるプライマーセットである、請求項「「記載の妊芋性検査キット。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/001850

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09 (2006.01)±, C07K16/40 (2006.01)i, *C12N9/90* (2006.01)i, *C12Q1/533* (2006.01)i, C22Q2/68 (2006.01)i, *G01N33/53* (2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09, C07K16/40, C12N9/90, C12Q1/533, C12Q1/68, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamll), WPI, BIOSIS (STN), CAplus (STN), MEDLINE (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Dierick H. A. et al., A phosphoglycerate mutase brain isoform (PGAMl) pseudogene is localized within the human Menkes disease gene (ATP7A)., Gene, 1997, Vol. 198, p.37-41	7/1-6, 8-13
A	JP 7-258299 A (Oriental Yeast Co., Ltd.), 09 October 1995 (09.10.1995), (Family: none)	1-13
A	Betran E. et al., Evolution of the phosphoglycerate mutase processed gene in human and chimpanzee revealing the origin of a new primate gene., MoI. Biol. Evol., 2002, Vol. 19, p.654-663	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 March, 2010 (30.03.10)	13 April, 2010 (13.04.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/001850

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hiromitsu TANAKA et al., "Seiso Seishoku Saibo Tokuiteki Idenshi no single-nucleotide polymorphism (SNP) Kaiseki", Proceedings of the Japan Society of Andrology the Annual Meeting, 2007, pages 152 to 153	1-13
A	Yasushi MIYAGAWA et al., "Dansei Funinsho Kanja ni Okeru Seiso Seishoku Saibo Tokuiteki Idenshi SNP Kaiseki to sono Rinsho Oyo", Proceedings of the Japan Society of Andrology the Annual Meeting, 2008, pages 82 to 83	1-13
A	Yasushi MIYAGAWA et al., "Dansei Funinsho to Seishi Keisei Idenshi", Proceeding of the Japanese Society of Animal Models for Human Diseases, 2004, vol. 20, pages 29 to 34	1-13
A	Hiromitsu TANAKA, "Dansei Funinsho no Gen 'in Idenshi no Dotei to Rinsho Oyo", Kosei Rodo Kagaku Kenkyuhi Hojokin Hito Genome Saisei Iryo To Kenkyu Jigyo Heisei 15 Nendo Sokatsu Kenkyu Hokokusho, 2004, pages 19 to 22	1-13

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2010/001850

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

IntCl C12N15/09(2006.01)i, C07K16/40(2006.01)i, C12N9/90(2006.01)i, C12Q1/533(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

IntCl C12N15/09, C07K16/40, C12N9/90, C12Q1/533, C12Q1/68, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922－1996年
日本国公開実用新案公報	1971－2010年
日本国実用新案登録公報	1996-2010年
日本国登録実用新案公報	1994-2010年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

ISTPlus/JMEDPlus/JST 758O(JDreamll), WPI, BIOSIS(STN), CAplus (STN), MEDLINE(STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X/A	Dierick H. A. et al., A phosphoglycerate rautase brain isoforra (PGAMl) pseudogene is localized within the human Menkes disease gene (ATP7A)., Gene, 1997, Vol. 198, p.37-41	7/1-6, 8-13
A	JP 7-258299 A (オリエンタル酵母工業株式会社) 1995. 10. 09, (ファミリーなし)	1-13

洋 C欄の続きにも文献が列挙されている。

ヴ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
30.03.2010	13.04.2010

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）
日本国特許庁（ISA/JP） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	4N 3846 滝口 尚良 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式PCT/ISA/210（第2ページ）（2009年7月）

C (続き) .　関連すると沼められる文献

引用文献のテコリーホ	引用文献名　及ひ一部の箇所か関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請大項の番号
A	Betran E. et al., Evoluti˙on of the phosphoglyce ┬ate rautase p┬ocessed gene in human and chïmpanzee ┬eveali˙ng the o┬igin of a new prïmate gene. , MoI. Biol. Evol. , 2002, Vol. 19, p . 654-663	1-13
A	田中宏光ほか, 桔央生殖細胞特典的遺伝子の single-nucl oootide polymorphism (SNP) 解材f, 日本アントP P ジー学会総会記事, 2007, 第１５２- １５３頁	1-13
A	宮川康ほか, 男性不妊症忠者における桔央生殖細胞特典的遺伝子 SNP 解析とその臨床応用, 日本アントP P ジー学会総会記事, 2008, 第８２- ８３頁	1-13
A	宮川康ほか, 男性不妊症と精子形成遺伝子, 日本疾忠モデル学会記録, 2004, Vol. 20, 第２９- ３４頁	1-13
A	田中宏光, 男性不妊症の原因遺伝子の同定と臨床応用, 厚生労働科学研究費補助金　ヒトケノム・再生医療等研究事業 平成１５年度総括研究報告菩, 2004, 第１９- ２２頁	1-13

国際調査報告

国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２０１０ノ００１８５０

Ｉ欄　ヌクレオチト又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

１．この国際出願て開示されたヌクレオチト又はアミノ酸配列Jに関して、提出された以下の配列表に基つき国際調査を行った。

ａ．提出手段　　r　紙形式

洋　電子形式

ｂ．提出時期　　砕　出願時の国際出願に含まれていたもの

ぶ　この国際出願と共に電子形式により提出されたもの

ご　出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

２．r　さらに、複数の版の配JiJ表又は配JiJ表の写しを提出した場合、出願後に提出した配JiJの写し若しくは追加して提出した配JiJの写しか、出願時に提出した配JiJと同一てある旨又は出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出かあった。

３．補足意見